昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2015, 58(9): 959 - 965 doi:10.16380/j.kcxb.2015.09.004

重庆中华蜜蜂囊状幼虫病病毒多聚蛋白基因分子特性分析

沈克飞[#], 曹 兰[#], 郑 华, 杨 柳, 张邑帆, 张素辉[*]

(重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

摘要:【目的】分析地处中国南方的重庆地区中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*(简称"中蜂")囊状幼虫病病毒(sacbrood virus, SBV)(AcSBV-S. Chn-CQ)的遗传特性。【方法】采用 RT-PCR 法对采自重庆 23 个区县的阳性中蜂幼虫进行 SBV 多聚蛋白基因扩增、序列测定和序列分析,采用邻接法(neighbor-joining method)基于基因组和基因组片段 SB11-SB12 构建系统进化树,使用 RDP3 检测 SBV 的基因重组。【结果】AcSBV-S. Chn-CQ 与中国南方中蜂 SBV(AcSBV-S. Chn)其他分离株、越南北部东方蜜蜂 *A. cerana* SBV(AcSBV-N. Vie)、越南北部西方蜜蜂 *A. mellifera* SBV(AmSBV- N. Vie)、韩国东方蜜蜂 SBV(AcSBV-S. Kor)的同源性较高。AcSBV-S. Chn-CQ 在结构蛋白编码区域存在连续 51 个核苷酸缺失,在非结构蛋白编码区域有 3 个不连续的核苷酸缺失,与 AcSBV-N. Vie, AmSBV-N. Vie 和 AcSBV-S. Kor 核苷酸缺失相同。AcSBV-S. Chn-CQ 与 AcSBV-S. Chn-FZ, AcSBV-N. Vie, AmSBV-N. Vie 和 AcSBV-S. Kor 在亚洲基因型中形成一亚型,亚型内检测到重组事件。【结论】推测 AcSBV-S. Chn-CQ 与 SBV-N. Vie 和 AcSBV-S. Kor 可能来自一个共同祖先。

关键词: 中华蜜蜂; 囊状幼虫病病毒; 多聚蛋白基因; 核苷酸缺失; 系统进化

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2015)09-0959-07

Molecular characterization of the polyprotein gene of sacbrood virus isolated from *Apis cerana cerana* in Chongqiong, southwestern China

SHEN Ke-Fei[#], CAO Lan[#], ZHENG Hua, YANG Liu, ZHANG Yi-Fan, ZHANG Su-Hui[*] (Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China)

Abstract:【Aim】This study aims to analyze the genetic characteristics of sacbrooe virus (SBV) isolated from *Apis cerana cerana* in Chongqing, southwestern China (AcSBV-S. Chn-CQ).【Methods】The polyprotein gene of SBV was amplified by RT-PCR from samples of *A. c. cerana* larvae infected with SBV, which originated from 23 districts or counties in Chongqing, sequenced and analyzed. Phylogenetic trees were constructed using neighbor-joining method based on SBV genome, and the genomic region SB11-SB12. RDP3 was used to detect the genetic recombination.【Results】AcSBV-S. Chn-CQ showed high homologies with other SBV isolates from *A. c. cerana* in South China (AcSBV-S. Chn), the SBV infecting *A. cerana* and *A. mellifera* in North Vietnam (AcSBV-N. Vie and AmSBV-N. Vie) and the SBV infecting *A. cerana* in South Korea (AcSBV-S. Kor). AcSBV-S. Chn-CQ has a consecutive 51-nucleotide deletion along the structural protein-coding region and an inconsecutive 3-nucleotide deletion along the nonstructural protein-coding region, and its nucleotide deletion is identical to those of AcSBV-N. Vie, AmSBV-N. Vie and AcSBV-S. Kor. AcSBV-S. Chn-CQ, AcSBV-S. Chn-FZ, AcSBV-N. Vie, AmSBV-N. Vie and AcSBV-S. Kor formed a subtype within the Asian genotype, and recombination events were detected in the isolates within this subtype.【Conclusion】AcSBV-S. Chn-CQ, SBV-N. Vie and AcSBV-S. Kor may share a common origin.

Key words: *Apis cerana cerana*; sacbrood virus (SBV); polyprotein gene; nucleotide deletion; phylogeny

---

基金项目: 重庆市基本科研业务费项目(15441)

作者简介: 沈克飞, 男, 1980 年 12 月生, 安徽六安人, 硕士, 助理研究员, 从事蜜蜂保护学研究, E-mail: coffeeshine@163.com; 曹兰, 女, 1980 年 10 月生, 重庆江津人, 本科, 助理研究员, 从事蜜蜂保护学研究, E-mail: fyscl2010@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: 446116409@qq.com

收稿日期 Received: 2015-03-16; 接受日期 Accepted: 2015-07-17

蜜蜂囊状幼虫病病毒(sacbrood virus, SBV)是单股正链昆虫小 RNA 样病毒,包含一个开放阅读框(open reading frame, ORF),编码一条多聚蛋白(polyprotein)。已知在 GenBank 公布序列的 SBV 主要包含 2 大基因型,即亚洲基因型和欧洲基因型(或称为东方蜜蜂 *Apis cerana* 基因型和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因型)(Ghosh *et al*., 1999; 曹兰等, 2012),分别感染东方蜜蜂和西方蜜蜂(Grabensteiner *et al*., 2001; Kojima *et al*., 2011),表现出宿主特异性(Kojima *et al*., 2011)。这其中也有少数感染亚洲饲养的西方蜜蜂 SBV 属于亚洲基因型,在以前的 SBV 系统进化分析中将其视为例外(Grabensteiner *et al*., 2001; Kojima *et al*., 2011; Choe *et al*., 2012b; Yang *et al*., 2013)。SBV 可感染幼虫和成蜂,主要造成幼虫死亡,危害蜜蜂繁殖和蜂群群势。相对于西方蜜蜂,包括中华蜜蜂 *A. cerana cerana*(简称"中蜂")在内的东方蜜蜂对 SBV 更易感,SBV 感染产生的症状典型,所造成的危害更大(Grabensteiner *et al*., 2001)。重庆地区地处西南,是我国重要的中蜂饲养区,也是 SBV 的流行区。春季 SBV 流行期恰处该地区油菜花流蜜期,不仅影响中蜂繁殖也有损蜂农经济利益。最近,GenBank 公布了多条东方蜜蜂 SBV 和西方蜜蜂 SBV 的基因组序列。我们利用这些基因组序列,对 AcSBV-S. Chn-CQ 进行序列分析和系统进化分析。结果发现除了东方蜜蜂 SBV 外,AcSBV-S. Chn-CQ 与 AmSBV-N. Vie 有最近亲缘关系。

1 材料和方法

1.1 样本

经 RT-PCR 法(Shen *et al*., 2012)鉴定为囊状幼虫病病毒感染的病死中蜂 *A. c. cerana* 幼虫,采自 2010–2014 年间暴发囊状幼虫病的重庆中蜂场,样本于 –80℃保存。样品采集地分布在重庆中部、西部、东南和东北的 23 个区县。

1.2 主要试剂

rTap、pMD18-T 载体、Trizol 和 PrimeScript RT-PCR Kit 均购自 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.3 总 RNA 提取

将冷冻样本取出解冻,吸取 50~100 μL 样本渗出液加 Trizol 试剂至 1 mL,室温静置 15 min 后,加入 250 μL 氯仿,充分振荡后室温静置 15 min,4℃ 12 000 r/mim 离心 15 min;取上清,加入等体积的异丙醇,混匀后于 –20℃静置 1 h;4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 70% 乙醇洗涤 1 次,吸干上清,沉淀溶解于 100 μL 经 DEPC 处理的去离子水中,以备反转录使用。

1.4 引物

根据 AcSBV-S. Chn-GZ 基因组序列(GenBank 登录号 AF469603)设计扩增 SBV 多聚蛋白基因的引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 用于 SBV 基因组扩增的引物

Table 1 Primers for amplification of SBV genome

引物名称 Primer	引物序列 (5′–3′) Primer sequence	核苷酸位置 Nucleotide position	扩增子大小(bp) Amplicon size
CSBV1F	ACCAACCGATTCCTCA	180–195	1 114
CSBV1R	ACGACATACCCGCAAA	1 278–1 293	
CSBV2F	GTTAGGAATCAAACGCACAA	1 125–1 144	1 224
CSBV2R	GGGCAGGAATCTATGTGG	2 331–2 348	
CSBV3F	CCACCTGATGGTTATG	2 220–2 235	772
CSBV3R	TACCAGTATCGCCTTT	2 951–2 967	
CSBV4F	TCAGCGGAACTACTCAT	2 976–2 991	1 052
CSBV4R	TCAGCGGAACTACTCAT	3 987–4 002	
CSBV5F	GTTGTCTGGAGGAAGC	3 821–3 836	835
CSBV5R	CCTACGGTAAATTGCACTG	4 637–4 655	
CSBV6F	ACCCAGTGCAATTTACC	4 634–4 650	1 000
CSBV6R	CATTCGACGGAGTACATT	5 526–5 543	
CSBV7F	CGAATGTTGGGAGGTA	5 538–5 553	896
CSBV7R	GAATCAAGGGATGGGT	6 418–6 433	
CSBV8F	GAACAGGGATCCCTTGA	6 414–6 430	1 007
CSBV8R	GATAACCACCCGTCCC	7 405–7 420	
CSBV9F	GGAATGTTGGGAATTACC	7 103–7 120	1 620
CSBV9R	GACTAATAACTAATTTCGGGATA	8 700–8 722	

核苷酸位置参考 AcSBV-S. Chn-GZ (GenBank 登录号 AF469603)。The nucleotide positions refer to the genome sequence of AcSBV-S. Chn-GZ (GenBank accession no. AF469603).

1.5 RT-PCR

使用 PrimeScript RT-PCR Kit 及其 Random 6mers 以提取的 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一条链,实验操作按试剂盒说明书进行。以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系为:10 × PCR Buffer(含 15 mmol/L Mg^{2+}) 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 5 U/μL rTaq 0.1 μL, 10 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 0.5 μL,补去离子水至 25 μL。反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,45℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共 30 个循环;72℃再延伸 5 min。所用引物见表 1。

1.6　条带分析及序列测定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，回收目的条带，将其克隆至 pMD18-T 载体，用通用引物 M13 +/M13 - 对其进行双向序列测定，每个扩增片段至少测序 3 个重组质粒。

1.7　序列分析

将所得序列在 NCBI 上作 BLAST 搜索以进行同源性分析。使用 ClustalW2 软件(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/#)进行多序列比对分析。使用在线软件(http://web.expasy.org/translate/)翻译所得片段，在 NCBI 上进行保守结构域 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)。采用 MEGA 4 软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ)，基于基因组和基因组片段 SB11-SB12(Grabensteiner *et al.*, 2001)(对应于 AcSBV-S. Chn-GZ 基因组的第 5 537 - 6 433 位核苷酸)构建 SBV 系统进化树。使用 RDP4 软件分析 SBV 的基因重组。

2　结果

2.1　SBV 基因序列分析

经序列测定及序列分析获得一条长度为 8 488 nt 的 SBV 基因组编码序列，约占 SBV 基因组长度的 97%，多聚蛋白基因的 99.6%。序列已提交 GenBank，登录号为 KJ716805 和 KJ716806。多序列比对发现，AcSBV-S. Chn-CQ 与 AcSBV-S. Chn-FZ (GenBank 登录号 KM495267)、AcSBV-S. Chn-GZ (GenBank 登录号 AF469603)、AcSBV-N. Vie (AcSBV-N. Vie1, GenBank 登录号 KM884990; AcSBV-N. Vie2, GenBank 登录号 KM884991 等)、AmSBV-N. Vie (GenBank 登录号 KM884993)、AcSBV-S. Kor(GenBank 登录号 HQ322114)的同源性高于与中国北方中蜂 SBV (AcSBV-N. Chn)(AcSBV-N. Chn-LN, GenBank 登录号 HM237361; AcSBV-N. Chn-BJ, GenBank 登录号 KF960044; AcSBV-N. Chn-SX, GenBank 登录号 KJ000692)的同源性(表 2)。序列分析也发现在引物对 CSBV3F/CSBV3R 和 CSBV8F/CSBV8R 所扩增片段处，与 AcSBV-S. Chn-GZ 相比，AcSBV-S. Chn-CQ 存在 2 段核苷酸缺失。第 1 段为连续 51 个核苷酸缺失(对应于 AcSBV-S. Chn-GZ 的第 2 265 - 2 323 位核苷酸)(图 1：A)。第 2 段为 3 个不连续核苷酸缺失(对应于 AcSBV-S. Chn-GZ 的第 6 502 - 6 565 位核苷酸)(图 1：B)。为了验证这种核苷酸缺失，使用引物对 CSBV3F/CSBV3R 和 CSBV8F/CSBV8R，对采自 2010 - 2014 年间的分布在重庆中部、西部、东南和东北的 23 个区县的 53 份阳性中蜂样本，进行 RT-PCR 扩增、序列测定和序列比对，结果发现该核苷酸插入/缺失模式是真实存在于 AcSBV-S. Chn-CQ，并且 AcSBV-S. Chn-CQ 与 AcSBV-N. Vie，AmSBV-N. Vie 及 AcSBV-S. Kor 核苷酸插入/缺失模式相同。部分序列信息已提交 GenBank，登录号为 KJ740735 - KJ740744。

表 2　AcSBV-S. Chn-CQ 序列同源性比较

Table 2　Sequence homology of AcSBV-CQ

编号 No.	序列 Sequence	GenBank 登录号 GenBank accession no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	AcSBV-S. Chn-CQ	KJ716806		98	97	97	96	97	95	94	93	93	93	93	93	93	92	91	90
2	AcSBV-S. Chn-CQ1	KJ716805	98		97	97	96	97	95	94	93	93	93	93	93	93	92	91	90
3	AcSBV- S. Chn-FZ	KM495267	97	97		97	96	97	95	94	94	94	93	93	93	93	93	91	90
4	AcSBV-N. Vie1	KM884990	97	97	97		97	96	94	94	93	93	93	93	93	92	92	90	90
5	AmSBV-N. Vie4	KM884993	96	96	96	97		96	94	94	93	93	93	93	93	92	92	91	90
6	AcSBV-S. Chn-GZ	AF469603	97	97	97	97	96		95	94	94	94	93	93	93	93	91	91	91
7	AcSBV-S. Kor	HQ322114	95	95	95	94	94	97		98	93	93	93	93	93	93	92	90	90
8	AmSBV-S. Kor19	JQ390592	94	94	94	94	94	96	98		93	92	93	93	92	92	92	91	90
9	AcSBV-S. Vie-SBM2	KC007374	93	93	94	93	93	95	93	93		94	94	94	94	94	94	91	91
10	AcSBV-N. Chn-LN	HM237361	93	93	94	93	93	94	93	92	94		93	93	93	93	93	91	90
11	AcSBV-N. Chn-SX	KJ000692	93	93	93	93	93	94	93	93	94	93		99	93	95	92	91	90
12	AcSBV-N. Chn-BJ	KF960044	93	93	93	93	93	94	93	93	94	93	99		93	99	92	91	90
13	AcSBV-S. Vie-LDst	KJ959613	93	93	93	93	93	94	93	92	94	93	93	94		99	94	91	90
14	AmSBV-N. Vie6	KM884995	93	93	93	92	93	93	90	92	94	93	93	93	99		94	91	90
15	AcSBV-Ind-II-9	JX270800	92	92	93	92	92	93	92	92	94	93	92	92	94	94		90	90
16	AmSBV-NPG	KJ629183	91	91	91	90	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	90		92
17	AmSBV-UK	AF092924	90	90	90	90	90	90	90	91	91	90	90	90	90	90	90	92	

Am：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；Ac：东方蜜蜂 *Apis cerana*.

A

```
AcSBV-S.Chn-GZ_AF469603        CATCAAACAG-ACCAAGAAGGGAGATGGGTTCTCCAGATAGCGATGGGGGTAAGGGACAATCTGTGGTAGCAGGATCAGA 2326
AcSBV-S.Chn-CQ1_KJ716805       CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 2079
AcSBV-S.Chn-CQ_KJ716806        CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 2079
AcSBV-S.Chn-CQ2_KJ740735       CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 56
AcSBV-S.Chn-CQ3_KJ740736       CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 56
AcSBV-S.Chn-CQ4_KJ740737       CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 56
AcSBV-S.Chn-CQ5_KJ740738       CACCAAATAG-ACCAGGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 56
AcSBV-N.Vie1_KM884990          CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 2317
AcSBV-N.Vie2_KM884991          CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 2316
AmSBV-N.Vie4_KM884993          CAGCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 2316
AcSBV-S.Kor_HQ322114           CGCCAAATAG-ACCAAGAAGAGA----------------------------------------------------ATCAGA 2324
AcSBV-S.Chn-FZ_KM495267        CAGCAAATAGCACCAGGAA-------------------------------TAAGAGACAATCTGTGGT---------AGA 2327
AcSBV-N.Chn-BJ_KF960044        CAACAAATAG-ACCAACAAGGGGGGTGGGTTCGCCAGATAGCAATGGGGGTAAGGGACAATCTACGGTAGCCGTATCAGA 2366
AcSBV-N.Chn-SX_KJ000692        CAACAAATAG-ACCAACAAGGGGGGTGGGTTCGCCAGATAGCAATGGGGGTAAGGGACAATCTGCGGTAGCCGTACCAGA 2287
AcSBV-S.Vie-SBM2_KC007374      CATCAAACAG-ACCAAGAAGGGAGATGGGTTCTCCAGATAGCGATGGGGGTAAGGGACAATCTGTGGTAGCAGCATCAGA 2366
AcSBV-S.Vie-LDst_KJ959613      CAACAAATAA-AGCAAGAAGGGAGTTGGTCTCTTCAGGTAGTAATGGGGGTAAGGGACAATCTGTGGTAGCAGTATCAGA 2369
AmSBV-S.Viet6_KM884995         CAACAAATAA-AGCAAGAAGGGAGTTGGTCTCTTCAGGTAGTAATGGGGGTAAGGGACAATCTGTGGTAGCAGTATCAGA 2366
AcSBV-Ind-II-9_JX270800        CA---------ATCAAGA----------------------GCAATGGGGGTAAGGGACAATCTGTGGTAGCAGTATCAAA 2304
AcSBV-N.Chn-LN_HM237361        CG---------ACAAATA----------------------GCAATAGGGATAAGAGACAATCTGTGGTAG---------A 2327
AmSBV-UK_AF092924              CACCAAATAG-ATCAAGAAGGGAG---GCCTCTCCGAATAGTGATGGAGGTAAGGGACAACCTGAGGTGGCAGTGTCAGA 2364
AmSBV-S.Kor21_JQ390591         CACCAAATAG-ATCAAGGAGAGAGTTAGCCTCTACAGATAGTGATGGGGGTAAGGGAGAGCCTGTGTCGGTGGGGTCAGA 2367
AmSBV-Npg_KJ62918              CACCGAATAG-ATCAAGAAGGCAGTTAGTCTATCCAGATAGTGATGGGGGTAAGGGACAACCTGAGGTGGCAGTGTCAGA 2127
```

B

```
AcSBV-S.Chn-GZ_AF469603        GAAAGTTAACTGCATGTGGCATTTATGGGACAGTGGCCTTGTTACCCAGGCATTTTGTGCCGTGCCTATT 6569
AcSBV-S.Chn-CQ1_KJ716805       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 6319
AcSBV-S.Chn-CQ_KJ716806        GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 6319
AcSBV-S.Chn-CQ2_KJ740739       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 111
AcSBV-S.Chn-CQ3_KJ740740       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 111
AcSBV-S.Chn-CQ4_KJ740741       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGC-GAGC-TATT 111
AcSBV-S.Chn-CQ5_KJ740742       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 111
AcSBV-S.Chn-CQ8_KJ740743       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 111
AcSBV-S.Chn-CQ9_KJ740744       GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 111
AcSBV-N.Vie1_KM884990          GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGC-GAGC-TATT 6557
AcSBV-N.Vie2_KM884991          GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGC-GAGC-TATT 6556
AmSBV-N.Vie4_KM884993          GAA-GTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGC-GAGC-TATT 6556
AcSBV-S.Kor_HQ322114           GAA-GTTAACTGCATGTGGTATTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-TATT 6564
AcSBV-S.Chn-FZ_KM495267        GAAAGTTAACTGCATGTGGCCTTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGCCGTGCCTATT 6570
AcSBV-N.Chn-BJ_KF960044        GAAAGTTAACCGCATGTGGTATTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGCCGTGCCTATT 6609
AcSBV-N.Chn-SX_KJ000692        GAAAGTTAACCGCATGTGGTATTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGCCGTGCCTATT 6530
AcSBV-S.Vie-SBM2_KC007374      GAA-GTTAACTGCATGCGGTATTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-CATT 6606
AcSBV-S.Vie-LDst_KJ959613      GAA-GTTAACCGCTTGTGGCATTTATGGGACAGTGGCTCTGTTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-CATT 6609
AmSBV-S.Vie6_KM884995          GAA-GTTAACCGCTTGTGGCATTTATGGGACAGTGGCTCTGTTACCGAGGCATTATGTGC-GTGC-CATT 6606
AcSBV-Ind_JX270800             GAA-GTTAACTGCATGCGGTATTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCAAGGCATTATGTGC-GTGCC-ATT 6544
AcSBV-N.Chn-LN_HM237361        GAAAGTTAACTGCATGCGGCATTTATGGGACAGTGGCTCTATTACCGAGGCATTATGTGCCGTGCCTATT 6570
AmSBV-UK_AF092924              GAA-GTTAACCGCATGCGGTATTTATGGAACAGTGGCGTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGCC-ATT 6604
AmSBV-S.Kor21_JQ390591         GAA-GTTAACTGCATGTGGTATTTATGGGACAGTGGCGTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGCC-ATT 6607
AmSBV-Npg_KJ62918              GAA-GTTAACTGCGTGTGGTATTTATGGGACAGTGGCTTTATTACCGAGGCATTATGTGC-GTGCC-ATT 6367
```

图 1 SBV 多聚蛋白基因中核苷酸缺失区域

Fig. 1 Deleted regions in the polyprotein gene of SBV

AcSBV-S. Chn-CQ 在 AcSBV-S. Chn-GZ 基因组的第 2 270 – 2 320（A）位核苷酸出现连续 51 个核苷酸缺失，在第 6 502 – 6 564 位（B）核苷酸出现不连续的 3 个核苷酸缺失。AcSBV-S. Chn-CQ has a consecutive 51-nucleotide and an inconsecutive 3-nucleotide deletion at nucleotide positions 2 270 – 2 320（A）and 6 502 – 6 564（B）compared with AcSBV-S. Chn-GZ, respectively. Am：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；Ac：东方蜜蜂 *Apis cerana*.

8 488 nt 的 SBV 核苷酸序列编码一条由 2 828 个氨基酸残基组成多聚蛋白序列。经保守结构域 BLAST 搜索，所推导的多聚蛋白 N 端为结构蛋白，包含 2 个小 RNA 病毒衣壳蛋白药物结合口袋（drug-binding pocket）结构域（domain），分别位于第 174 – 368 位和第 447 – 661 位氨基酸残基；C 端为非结构蛋白，包含 RNA 解旋酶、3C 丝氨酸蛋白酶、RNA 依赖的 RNA 聚合酶结构域，分别位于第 1 340 – 1 449，2 051 – 2 280 和 2 314 – 2 803 位氨基酸残基。

2.2 SBV 的系统进化分析

从基因组水平的进化树上可见，SBV 主要划分为亚洲基因型和欧洲基因型（图 2）。AcSBV-S. Chn-CQ 与 AcSBV-S. Chn-FZ，AcSBV-N. Vie，AmSBV-N. Vie 和 AcSBV-S. Kor 构成亚洲基因型中的一亚型。AcSBV-S. Chn 与 AcSBV-N. Chn 形成 2 个单独进化分支。以基因组相应片段为参考，SB11-SB12 进化树（图 3）的拓扑图与 SBV 基因组进化树相似。从该图可见，AcSBV-S. Chn-CQ 与众多 AmSBV-N. Vie 聚成亚群。

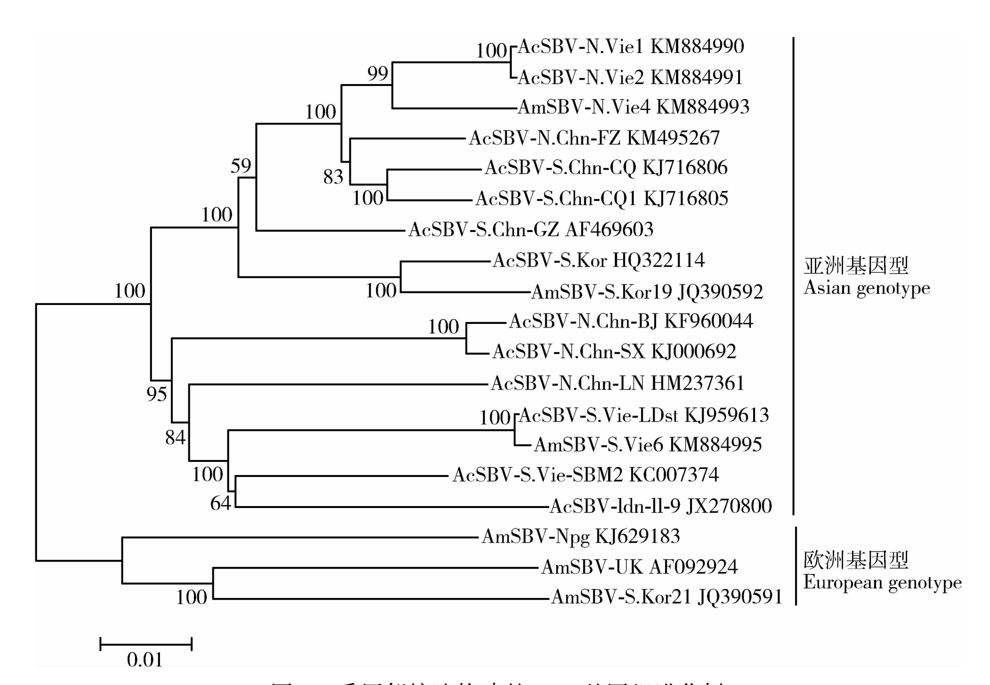


图 2　采用邻接法构建的 SBV 基因组进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of SBV based on the genome using the neighbor-joining method

Am：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；Ac：东方蜜蜂 *Apis cerana*.

AcSBV-N.Vie1 KM884990
AcSBV-N.Vie2 KM884991
AmSBV-N.Vie4 KM884993
AmSBV-N.Vie-Hoabinh HQ616656
AmSBV-N.Vie-Hagiang HQ616654
AcSBV-S.Chn-FZ KM495267
AcSBV-S.Chn-CQ KJ716806
AcSBV-S.Chn-CQ1 KJ716805
AmSBV-N.Vie-Hanoi HQ646655
AcSBV-S.Chn-GZ AF69603
AmSBV-N.Vie-Haihung AY311387
AcSBV-S.Kor HQ322114
AcSBV-S.Kor1 JQ267658
AcSBV-S.Kor2 JQ267659
AcSBV-N.Chn-BJ KF960044
AcSBV-N.Chn-SX KJ000692
AcSBV-S.Vie-SBM2 KC007374
AcSBV-S.Vie-LDst KJ959613
AmSBV-Nep1 AF284658
AmSBV-Ind-K3A JX270798
AcSBV-Ind-ll9 JX270800
AcSBV-Ind-ll10 JX194121
AmSBV-Npg KJ629183
AmSBV-UK AF092924
AmSBV-S.Kor21 JQ390591
AmSBV-Nep3 AF284659
AmSBV-Ger1 AF284651
AmSBV-Aus AF284649
亚洲基因型
Asian genotype
欧洲基因型
European genotype
0.01

图 3　采用邻接法构建的 SBV SB11-SB12 片段进化树

Fig. 3　Phylogenetic trees of SBV based on the genomic region SB11-SB12 using the neighbor-joining method

Am：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；Ac：东方蜜蜂 *Apis cerana*.

2.3 SBV 的基因重组分析

使用 Bootscan 方法进行重组分析，未发现 AcSBV-S. Chn-CQ 发生重组。但发现 AmSBV-N. Vie4 可能是重组体，与其所在亚型 SBV 发生重组(图 4)。AmSBV-N. Vie4 与 AcSBV-N. Vie1 的核苷酸序列一致性高于 98.4%，但在第 587 – 1 978 位核苷酸，两者一致性为 93%；而此段 AmSBV-N. Vie4 与同亚型的 AcSBV-N. Vie3 的一致性为 95%。

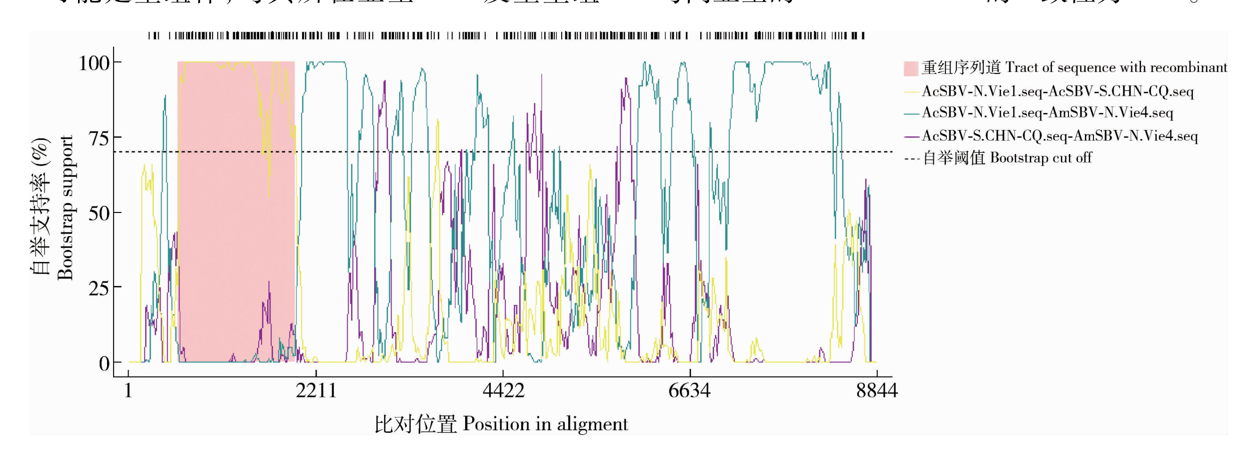


图 4 SBV 重组分析

Fig. 4 Recombinant analysis of SBV

3 讨论

突变驱动 SBV 进化(Roberts *et al.*, 2014)。SBV 具有点突变和核苷酸插入/缺失 2 种变异模式(Grabensteiner *et al.*, 2001; Choe *et al.*, 2012a, 2012b; Ma *et al.*, 2011)。点突变使 SBV 基因组序列具有明显的区域特性，同一地域或相近地域的同宿主种群 SBV 的点突变模式较一致，同源性高，如韩国东方蜜蜂 SBV(Choe *et al.*, 2012b)、广州中蜂和重庆中蜂 SBV(罗文华等, 2013)。本研究发现，除了 AcSBV-S. Chn-FZ 之外，SBV 多聚蛋白基因核苷酸插入/缺失出现在基因组的 2 个片段上。第 1 段位于结构蛋白编码基因上，是连续核苷酸缺失；第 2 段位于非结构蛋白编码基因上，是 3 个不连续的核苷酸缺失。这提示 SBV 编码序列插入/缺失可能由同一次突变事件造成，相同插入/缺失模式的 SBV 可能来自同一祖先。由此推测 AcSBV-S. Chn-CQ 与 AcSBV-N. Vie, AmSBV-N. Vie 和 AcSBV-S. Kor 可能有共同起源。由于遥远的地理距离使 AcSBV-S. Chn-CQ 与 AcSBV-S. Kor 的同源性低于地域上相近的 AcSBV-S. Chn-GZ 和 AcSBV-Chn-FZ 的同源性。

在基因组水平进化树中，可将已知序列的 SBV 主要分为亚洲基因型和欧洲基因型。AcSBV-S. Chn-CQ 属于亚洲基因型，且与 AcSBV-S. Chn 其他分离株聚成亚型，而不与 AcSBV-N. Chn 聚为亚型。这表明中蜂 SBV 存在南北方隔离进化的趋势。而这种趋势是由中蜂地理亚群造成，还是由气候等其他因素造成的，有待研究。值得注意的是，AcSBV-S. Chn-CQ 与众多 AmSBV-N. Vie 聚成亚群，类似现象在以前的研究也多次发现，常被视作例外(Grabensteiner *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2011; Choe *et al.*, 2012b; Yang *et al.*, 2013)。而众多来自亚洲西方蜜蜂的 SBV 与东方蜜蜂 SBV 聚成亚群，显示这种现象是真实存在的。重组分析得出，两株越南西蜂 SBV(AmSBV-N. Vie4 和 AmSBV-S. Vie6)均未与欧洲基因型 SBV 发生重组，而与同亚型的东方蜜蜂 SBV 在基因水平上具有一致的相似性。表明这两株 SBV 均来自东方蜜蜂，或是东方蜜蜂 SBV 的变异株。这和与欧洲基因型 SBV 发生重组的 AmSBV-Kor19 不同(Choe *et al.*, 2012a)。这提示越南东方蜜蜂 SBV 或其突变体可直接或间接感染越南西方蜜蜂。因此，从现实角度考虑 SBV 的宿主特异性已不成立。从已知序列 SBV 的采集地来看，属于亚洲基因型的西方蜜蜂饲养地主要分布在印度、尼泊尔(Grabensteiner *et al.*, 2001)、中国(Yang *et al.*, 2013)、韩国(Choe *et al.*, 2012a)、越南等国家。研究这些地域的 SBV 的遗传特性将可能揭示 SBV 未知的遗传变异规律。

参考文献(References)

Cao L, Shen KF, Zhang YF, Luo WH, Wang RS, Ren Q, Guo J, Wang ZD, Dai RG, 2012. Genotyping of sacbrood virus. *Progr. Vet. Med.*, 33(1): 44-47. [曹兰, 沈克飞, 张邑帆, 罗文华, 王

瑞生，任勤，郭军，王志冬，戴荣国，2012. 蜜蜂囊状幼虫病病毒的基因型分析. 动物医学进展，33(1)：44 -47]

Cao L，Zhang YF，Shen KF，Ren Q，Yang L，Fu LZ，2013. Analysis of encoding sequence of Chinese sacbrood virus. *Chin. J. Biologicals*，26(11)：1561 -1566. [曹兰，张邑帆，沈克飞，任勤，杨柳，付利芝，2013. 中蜂囊状幼虫病病毒重庆株编码序列分析. 中国生物制品学杂志，26(11)：1561 -1566]

Choe SE，Nguyen LTK，Noh JH，Kweon CH，Reddy KE，Koh HB，Chang KY，Kang SW，2012a. Analysis of the complete genome sequence of two Korean sacbrood viruses in the Honey bee，*Apis mellifera*. *Virology*，432(1)：155 -161.

Choe SE，Nguyen TTD，Hyun BH，Noh JH，Lee HS，Lee CH，Kang SW，2012b. Genetic and phylogenetic analysis of South Korean sacbrood virus isolates from infected honey bees (*Apis cerana*). *Vet. Microbiol.*，157(1 -2)：32 -40.

Ghosh RC，Ball BV，Willcocks MM，Carter MJ，1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honeybee：an insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.*，80：1541 -1549.

Grabensteiner E，Ritter W，Carter MJ，Davison S，Pechhacker H，Kolodziejek J，Boecking O，Derakhshifar I，Moosbeckhofer R，Licek E，Nowotny N，2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*)：rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*，8(1)：93 -104.

Kojima Y，Toki T，Morimoto T，Yoshiyama M，Kimura K，Kadowaki T，2011. Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan. *Microb. Ecol.*，62(4)：895 -906.

Luo WH，Zhang YF，Shen KF，Cao L，Yang R，Lu Y，2013. Genotype-specific genetic variation of sacbrood virus isolates from *Apis cerana cerana* in Chongqing region，China. *Chin. J. Biologicals*，26(3)：315 -323. [罗文华，张邑帆，沈克飞，曹兰，杨睿，卢茵，2013. 重庆地区中蜂囊状幼虫病病毒型特异性遗传变异分析. 中国生物制品学杂志，26(3)：315 -323]

Ma MX，Ming L，Jian C，Song Y，Shude W，Pengfei L，2011. Molecular and biological characterization of Chinese sacbrood virus LN isolate. *Comp. Funct. Genomics*，2011：409386.

Roberts JMK，Anderson DL，2014. A novel strain of sacbrood virus of interest to world apiculture. *J. Invertebr. Pathol.*，118：71 -74.

Shen KF，Cao L，Yang JL，2012. Rapid detection of sacbrood virus (SBV) by one step RT-PCR assay. *J. Anim. Vet. Adv.*，11(7)：931 -932.

Yang B，Peng G，Li T，Kadowaki T，2013. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses，*Nosema microsporidia*，protozoan parasites，and parasitic mites in China. *Ecol. Evol.*，3(2)：298 -311.

Zhang JQ，Feng JX，Liang YY，Chen DH，Zhou ZH，Zhang QF，Lu XY，2001. Three-dimensional structure of the Chinese sacbrood bee virus. *Sci. China Ser. C -Life Sci.*，44：444 -448.

（责任编辑：赵利辉）